

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.07.017

光敏水凝胶免疫识别严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 Spike 蛋白的快速纳米检测方法*

段醒妹^{1,2,3}, 陈小华^{1,2,3}, 帅 明^{1,2,3}

(1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610054; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院, 四川 成都 610072; 3. 个体化药物治疗四川省重点实验室, 四川 成都 610072)

摘要:目的 建立严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)Spike(S)蛋白的快速检测方法。方法 基于抗原-抗体免疫识别反应、纳米技术、光敏水凝胶技术,制备同时偶联抗体和光敏剂的纳米粒子溶液,SARS-CoV-2 表面的 S 蛋白可与纳米粒子上的抗体形成牢固的非共价结合,去除其余干扰性结合后,在波长为 405 nm 的蓝光和光引发剂 Irgacure 2959 的作用下,S 蛋白可使甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)水凝胶溶液由液态转变为固态。结果 制备的检测溶液中,S 蛋白抗体质量为 50~100 mg,疏基-Irgacure 2959 质量为 5~10 mg。同时,当 GelMA 水凝胶溶液的浓度为 5%~30%(m/V)时,检测效果较好。结论 该方法生产成本低,检测效率高,易于贮存和运输,对设备和操作人员的依赖性低,可用于快速检测 SARS-CoV-2 表面的 S 蛋白。

关键词:严重急性呼吸综合征冠状病毒 2;Spike 蛋白;抗原-抗体免疫识别反应;光敏水凝胶技术;纳米技术;快速检测

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)07-0071-04

Rapid Nano - Detection Method of Photosensitive Hydrogel Immunorecognition of Spike Protein of SARS-CoV-2

DUAN Xingmei^{1,2,3}, CHEN Xiaohua^{1,2,3}, SHUAI Ming^{1,2,3}

(1. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, China 610054; 2. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China 610072; 3. Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan, China 610072)

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for the Spike (S) protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Methods** Based on antigen-antibody immunorecognition response, nanotechnology and photosensitive hydrogel technology, nanoparticle solution with simultaneous coupling of antibody and photosensitizer was prepared. The S protein on the surface of SARS-CoV-2 could form a strong non-covalent binding with the antibody on the nanoparticle, and after the remaining interfering binding was removed, gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogel solution would be changed from liquid to solid under the action of blue light of 405 nm and photoinitiator Irgacure 2959 due to the S protein. **Results** In the prepared detection solution, the mass of S protein antibody was 50-100 mg and the mass of HS-irgacure 2959 was 5-10 mg. At the same time, when the concentration of GelMA hydrogel solution was 5%-30% (m/V), the detection effect was good. **Conclusion** The method has low production cost, high detection efficiency, easy storage and transportation, low dependence on equipment and operator, which can be used for rapid detection of the S protein on the surface of SARS-CoV-2.

Key words: SARS-CoV-2; Spike protein; antigen-antibody immunorecognition response; photosensitive hydrogel technology; nanotechnology; rapid detection

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)可导致病毒性肺炎或肺部感染,传染性高,具有广泛的组织嗜性^[1]。自 2019 年新型冠状病毒肺炎疫情暴发以来,基于聚合酶链式反应(PCR)技术的核酸检测试剂盒发挥了重要作用,但存在以下问题。1)SARS-CoV-2 为 RNA 病毒,需依次完成样本处理、集中送检,流程复杂,无法满足快速、高通量的检测需求,若仅采用核酸检测,易造成医疗拥挤,且部分患者无法及时确诊,导致治疗延误或疫情扩散;2)核酸检测条件要求较高,需专业人员和较严格的实验室条件;3)部分无症状感染

者携带病毒量较低,采集的样本中 SARS-CoV-2 核酸含量较低、PCR 实验操作失误或样本发生污染等均会产生假阴性结果^[2-4]。本研究中基于抗原-抗体免疫识别反应、纳米技术与光敏水凝胶技术,建立了快速检测 SARS-CoV-2 Spike(S)蛋白的方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

N-1300D-W 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);透析袋(北京索莱宝科技有限公司,批号为 807D022);WF-501B 型蓝光手电筒(美国 UltraFire 神

*基金项目:四川省医学重点学科(实验室)及重点专科立项项目[20PJ097];四川省科技计划项目[20YYJC1516]。

第一作者:段醒妹,女,博士,副研究员,研究方向为靶向递送载体,(电子信箱)duanxingmei2003@163.com。

火公司);GR110DP型高压灭菌器(美国致微仪器公司)。

1.2 试剂

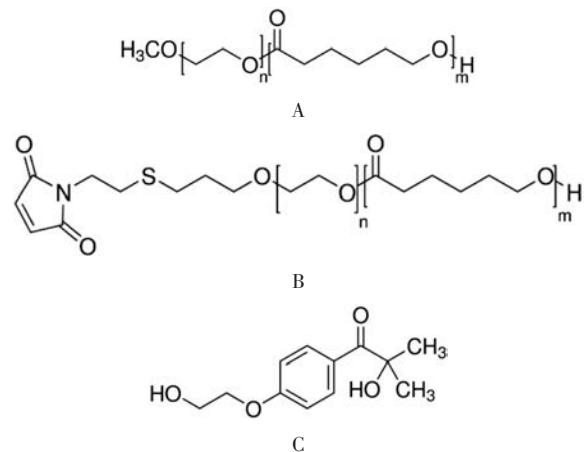
马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯(Mal-PEG-PCL)聚合物(批号为RP01631084),甲氧基聚乙二醇-聚己内酯(mPEG-PCL)聚合物(批号为RM019155),均购自西安瑞禧生物科技有限公司;S蛋白抗体[Human anti-SARS-CoV-2 Spike RBD antibody(hFC),成都正能生物技术有限责任公司,批号为S209906];S蛋白(美国OriGene公司,批号为TP701142);光引发剂Irgacure 2959(Merck & Co., Inc.,批号为410896);甲基丙烯酸酐(MA,批号为EFL-GM-30),明胶(批号为EFL-GEL-001),均购自苏州永沁泉智能设备有限公司;Hepes缓冲液(广州赛国生物科技有限公司,批号为EZ2811C237);其余试剂均为分析纯,购自美国Sigma-Aldrich公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

溶液A:分别取mPEG-PCL聚合物[相对分子质量(M_r)为4 000,PEG和PCL的 M_r 均为2 000,化学结构式见图1 A]10 mg和Mal-PEG-PCL聚合物(M_r 为4 000,PEG和PCL的 M_r 均为2 000,化学结构式见图1 B)90 mg,混匀,用二氯甲烷^[5-6]溶解,置温度为60℃的旋转蒸发仪中45 min,成膜。将膜取出,溶解于去离子水(或双蒸水、纯化水、生理盐水)中。在60℃水浴条件下振荡5 min,得质量浓度为10 mg/mL的聚乙二醇-聚己内酯-马来酰亚胺(MP-Mal)纳米粒溶液,置4℃条件下保存,备用。分别取MP-Mal纳米粒溶液100 mL和SARS-CoV-2 S蛋白抗体100 mg,溶于Hepes缓冲液中,混匀,置4℃条件下过夜,即得质量浓度为10 mg/mL的S蛋白抗体-MP-Mal纳米粒溶液,置4℃条件下保存,备用。取Irgacure 2959(化学结构式见图1 C)1.12 g(5 mmol)、巯基乙酸0.24 mL(3.4 mmol)、对甲苯磺酸0.16 g(0.83 mmol),溶于50 mL二氯甲烷中,在氮气保护下,于冷凝管中加热回流5 h,用旋转蒸发仪蒸干溶剂,最后用柱层析分离,即得目标修饰产物2-巯基乙酸-2-[4-(2-羟基-2-甲基丙酰基)苯氧基]乙酯和巯基-Irgacure 2959。取S蛋白抗体-MP-Mal纳米粒溶液10 mL、巯基-Irgacure 2959 6 mg,溶于Hepes缓冲液,混匀,置4℃条件下过夜。将混合溶液置透析袋(M_r 为2 000)中,透析液为蒸馏水,置4℃条件下过夜,即得S蛋白抗体-MP-Irgacure 2959纳米粒溶液(溶液A),置4℃条件下保存,备用。

溶液B:取纯化水,置500 mL锥形瓶中,于121℃高压灭菌器内灭菌40 min;将灭菌后的纯化水(溶液B)分



A. mPEG-PCL聚合物 B. Mal-PEG-PCL聚合物 C. Irgacure 2959

图1 化学结构式

A. mPEG-PCL polymer B. Mal-PEG-PCL polymer C. Irgacure 2959

Fig. 1 Chemical structures

装于安瓿瓶中,每瓶2 mL,密封,保存。

溶液C:取明胶10 g,精密称定,置100 mL磷酸盐缓冲液(PBS)中,60℃条件下搅拌至溶解,用滴液漏斗将8 mL MA缓慢滴入明胶溶液中,50℃条件下反应3 h。加入40℃预热的PBS 400 mL,将明胶溶液稀释5倍,用透析袋(M_r 为12 000~14 000)在温度为40℃、转速为300 r/min条件下透析7 d,再冻干7 d,使之呈白色泡沫状,即得甲基丙烯酸酐化明胶(GelMA),于4℃条件下保存。将GelMA用PBS溶解至浓度为25%(m/V)的GelMA水凝胶溶液(溶液C),以每瓶1 mL的量分装,于4℃条件下密封、避光,保存。

2.2 检测方法

1)取出咽拭子,去包装,将其浸入SARS-CoV-2 S蛋白溶液1 cm,充分沾染S蛋白。2)取出咽拭子,插入溶液A中,使拭子头完全浸没于溶液,搅拌3~5 s,使咽拭子上的SARS-CoV-2 S蛋白与溶液中纳米粒子上偶联的抗体形成较紧密的非共价结合。3)从溶液A中取出咽拭子,插入溶液B中,使拭子头完全浸没于溶液,搅拌3~5 s,充分洗涤。4)从溶液B中取出咽拭子,插入溶液C中,使拭子头完全浸没于溶液,搅拌3~5 s,取出。5)用蓝光手电筒(照射波长为405 nm)持续照射5~20 s,装载溶液C的试剂瓶与水平面保持垂直,光源入射角度需保证试剂瓶内溶液充分接受照射,倒置试剂瓶,使瓶身与水平面夹角为45°,观察瓶内溶液是否凝固,若瓶内溶液由液态转变为固态,溶液不沿瓶壁向下流动,为阳性,即含SARS-CoV-2 S蛋白;反之则为阴性,即不含SARS-CoV-2 S蛋白。

2.3 检测溶液制备原料比例的确定

通过前期筛选试验确定MP-Mal纳米粒中Mal-PEG-PCL聚合物与mPEG-PCL聚合物的质量比为

0.2~9.0。其中, Mal-PEG-PCL聚合物的质量为90 mg, mPEG-PCL聚合物的质量为10~450 mg。优选Mal-PEG-PCL聚合物9份(每份10 mg), mPEG-PCL聚合物1份(10 mg), mPEG-PCL聚合物的 M_r 为4 000~8 000, mPEG-PCL(1:1, M_r/M_r); Mal-PEG-PCL聚合物的 M_r 为4 000~8 000, PEG-PCL(1:1, M_r/M_r)。

前期制备溶液A时, 疏基-Irgacure 2959的质量为5~10 mg, 在此范围内, S蛋白抗体-MP-Irgacure 2959纳米粒可有效结合光敏水凝胶; 同时, 每次反应S蛋白抗体-MP-Mal纳米粒中S蛋白抗体的质量为50~100 mg, 在此范围内, S蛋白抗体-MP-Mal纳米粒可有效结合SARS-CoV-2 S蛋白, 并使溶液C中的光敏水凝胶固化。

Irgacure 2959为一种蓝光引发剂, 在波长为405 nm的蓝光作用下可迅速吸收能量, 产生自由基、阳离子等, 从而引发光敏水凝胶固化反应。本研究中, 疏基-Irgacure 2959的质量为5~10 mg, 且溶液C中GelMA水凝胶溶液的浓度为5%~30%(m/V)时, 经405 nm波长的蓝光照射, 能在光催化剂的作用下固化。

3 讨论

SARS-CoV-2的感染过程是由其表面的S蛋白与宿主细胞表面的血管紧张素转换酶2相互识别开启的^[7-8], S蛋白是一类三聚体跨膜糖蛋白, 在病毒表面形成特殊的花冠结构。SARS-CoV-2进入易感细胞, 需与S蛋白的受体结合和蛋白水解的协同作用, 促进病毒与细胞融合。由于S蛋白暴露于病毒表面, 并介导病毒进入宿主细胞, 故可作为SARS-CoV-2的抗原, 是抗病毒药物、治疗性抗体、诊断方法等开发的关键靶标^[9-10]。

纳米技术是研究结构尺寸为1~100 nm范围内材料的性质和应用的一种技术, 最终目标是直接以原子或分子形式构造具有特定功能的产品^[11-12]。纳米颗粒表面可提供偶联位点, 将能特异性识别S蛋白的抗体和光引发剂共同偶联于纳米颗粒, 以纳米颗粒为介质, 可将光敏水凝胶技术与免疫识别技术相结合。

mPEG-PCL是一种两嵌段聚合物, 一端为亲水链段甲氧基聚乙二醇, 另一端为亲油链段聚 ϵ -己内酯, 生物相容性和安全性均良好^[13]。Mal-PEG-PCL不仅具有生物可降解性、生物相容性、两亲性, 且能在水溶液中自动组装为纳米颗粒, 还能通过马来酰亚胺基团与抗体进行共价偶联, 是理想的纳米药物功能化载体骨架材料。

S蛋白抗体可与SARS-CoV-2 S蛋白的抗原结合, 从而发生免疫反应^[14-15], 使SARS-CoV-2与S蛋白抗体-MP-Irgacure 2959纳米粒相连。本研究中制

得的S蛋白抗体-MP-Irgacure 2959纳米粒能与SARS-CoV-2 S蛋白有效结合, 使SARS-CoV-2牢固连接在纳米粒上, 且能使光敏水凝胶在接触带有SARS-CoV-2的纳米粒溶液时迅速固化。

GelMA为双键改性明胶, 在光引发剂的作用下, 可通过紫外光及可见光交联固化成胶。GelMA光敏水凝胶具有天然和合成生物材料的特征, 其三维结构适于细胞生长和分化, 生物相容性和细胞反应特性良好^[16-17]。在405 nm波长的蓝光作用下, Irgacure 2959可使GelMA光敏水凝胶实现液态-固态的相互转变。

综上所述, 本研究中建立的方法生产成本低, 检测效率高, 易于贮存和运输, 对设备和操作人员的依赖性低, 可用于快速检测SARS-CoV-2表面的S蛋白。

参考文献

- [1] HARRISON AG, LINT, WANG P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis [J]. Trends Immunol, 2020, 41(12): 1100-1115.
- [2] TAKEUCHI Y, FURUCHI M, KAMIMOTO A, et al. Saliva-based PCR tests for SARS-CoV-2 detection [J]. J Oral Sci, 2020, 62(3): 350-351.
- [3] BWIRE GM, MAJIGO M, NJIRO BJ, et al. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis [J]. Journal of Medical Virology, 2021, 93(2): 719-725.
- [4] MAK GC, CHENG PK, LAU SS, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus [J]. Journal of Clinical Virology, 2020, 129: 104500.
- [5] MEN K, HUANG R, ZHANG XY, et al. Local and Systemic Delivery of Interleukin-12 Gene by Cationic Micelles for Cancer Immunogene Therapy [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2018, 14(10): 1719-1730.
- [6] MEN K, ZHANG R, ZHANG XY, et al. Delivery of modified mRNA encoding vesicular stomatitis virus matrix protein for colon cancer gene therapy [J]. Rsc Advances, 2018, 8: 12104-12115.
- [7] DINNES J, DEEKS JJ, BERHANE S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021, 3(3): CD013705.
- [8] VERDECCHIA P, CAVALLINI C, SPANEVELLO A, et al. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection [J]. European Journal of Internal Medicine, 2020, 76: 14-20.
- [9] DIAO B, WEN K, ZHANG J, et al. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2021, 27(2): 289.
- [10] SPEARMAN P. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 / COVID 19 [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2021, 33(1): 122-128.
- [11] FAROKHZAD OC, LANGER R. Impact of Nanotechnology on